

montrent que le collagelin se lie au collagène tissulaire sur coupe d'aorte et de queue de rat indiquant que le collagelin se comporte comme un traceur du collagène. Dans le modèle d'infarctus cicatriciel, une accumulation du collagelin radiomarqué est observée dans la zone cardiaque par scintigraphie planaire et tomographie chez les animaux avec MI mais pas chez les animaux contrôles ni avec un peptide contrôle. L'accumulation du traceur dans les zones de fibrose a été mise en évidence ex vivo par superposition des images d'autoradiographies et d'histologie sur coupes congelées.

**Conclusion** — Nous avons produit un peptide qui mime en partie le site de liaison de GPVI au collagène. Ce peptide se comporte comme un traceur spécifique du collagène in vitro et in vivo. Nous proposons que ce traceur pourrait être utile pour le diagnostic et le suivi évolutif de la fibrose dans un grand nombre de pathologies.

## A032

### SPECIFIC OVEREXPRESSION OF FCGRIIB ON MACROPHAGES REDUCES ATHEROSCLEROSIS IN LDLR DEFICIENT MICE

O. HERBIN<sup>1</sup>, M. ROMAIN<sup>1</sup>, M.-R. CLATWORTHY<sup>2</sup>, K.-G. SMITH<sup>2</sup>, B. ESPOSITO<sup>1</sup>, A. TEDGUI<sup>1</sup>, Z. MALLAT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Cardiovasculaire Inserm U689, Paris, France

<sup>2</sup> Cambridge Institute for medical Research, Cambridge, United Kingdom

Fc receptors for IgG are key players in regulating innate and adaptive immunity. Activation of Fc receptor triggers phagocytosis, inflammatory cytokine-release, antigen presentation, and regulation of humoral responses. FcγRIIb plays a unique role in negatively regulating immune responses. Atherosclerosis is an inflammatory disease in which monocytes/macrophages are deeply involved. The generation of mice overexpressing FcγRIIb on macrophages (M-TG) allowed us to explore the specific role of macrophages FcγRIIb expression in the development of atherosclerosis. To this end, we reconstituted lethally irradiated LDLr-deficient mice with bone marrow cells of either control or M-TG and after 4 weeks of recovery mice have been subjected to high fat diet during 11 weeks to induce atherogenesis. Our results show that LDLr<sup>-/-</sup> mice reconstituted with bone marrow of M-TG have 21% reduction of atherosclerotic plaque size in aortic sinus in comparison with control (p=0.01) despite a similar cholesterol level in both groups and the development of very advanced lesions. CD3-stimulated splenic T cells isolated from M-TG mice produced 46% less IFNγ (P<0.01) than CD4<sup>+</sup> T cells from control mice but same levels of IL4. There was no difference in the ability of regulatory T cells (Tregs) to inhibit effector CD4<sup>+</sup> cells proliferation. However, using flow cytometry we found a 34% increase of Tregs (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>) among CD4<sup>+</sup> cells in LDLr<sup>-/-</sup> M-TG mice compared to control mice (p<0.01).

These results clearly show that FcγRIIb overexpression on macrophages reduces atherosclerosis plaque development by triggering a phenotype shift of immune cells involved in atherosclerosis. Additional experiments are ongoing to understand mechanisms that induce T cell modulation.

## A033

### LA LONGUEUR DES TÉLOMÈRES LEUCOCYTAIRES EST ASSOCIÉE À LA VARIATION DE PARAMÈTRES FONCTIONNELS, BIOLOGIQUES ET GÉNIQUES CHEZ DES PATIENTS PRÉSENTANT UN INFARCTUS DU MYOCARDE

S. SALIQUES<sup>1</sup>, C. VERGELY<sup>1</sup>, M. ZELLER<sup>2</sup>, Y. COTTIN<sup>1,3</sup>, P. SICARD<sup>1</sup>, J.-E. WOLF<sup>3</sup>, A. DONZEL-JAVOUHEY<sup>4</sup>, J.-R. TEYSSIER<sup>1,4</sup>, L. ROCHETTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, Dijon, France

<sup>2</sup> IFR 100 Santé STIC, Dijon, France

<sup>3</sup> Service de Cardiologie CHU, Dijon, France

<sup>4</sup> Laboratoire de génétique moléculaire CHU, Dijon, France

**Objectifs** — Les télomères sont des structures nucléoprotéiques situées à l'extrémité des chromosomes. Leur fonction est de maintenir l'intégrité du génome au cours des divisions successives de la cellule. Du fait de leur forte proportion en guanine, ces structures sont très sensibles aux atteintes oxydantes et leur implication est démontrée dans les pathologies cardiovasculaires où une composante inflammatoire existe. Les objectifs notre étude ont été de déterminer les liens pouvant exister entre la longueur des télomères et certains paramètres géniques, métaboliques et cliniques chez des patients admis en Unité de Soins Intensifs Cardiologiques pour un infarctus du myocarde.

**Matériels et Méthodes** — Sur une cohorte de 67 patients, des données biologiques et cliniques ont été recueillies, dans le cadre de l'observatoire des Infarctus de Côte-d'Or : RICO. La longueur des télomères, ainsi que le niveau d'expression de 2 gènes impliqués dans les phénomènes d'adaptation de la cellule aux processus inflammatoires (c-Fos) et, dans la réparation de l'ADN (OGG1) suite à des dommages oxydatifs, ont été évalués sur l'ADN de leucocytes de patients par la technique de PCR quantitative en temps réel.

**Résultats** — Nos résultats montrent une forte corrélation entre la longueur des télomères et le facteur âge (r = 0,374, p = 0,001). Après avoir ajusté les données au facteur âge, il est démontré une corrélation positive entre la longueur des télomères, la clairance à la créatinine (r = -0,711, p < 0,001) et la Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche (r = -0,329, p = 0,008). De même, des corrélations négatives entre l'hypertension artérielle (HTA) (p = 0,023) et le niveau d'expression du gène c-Fos (r = 0,242, p = 0,045) ont été mises en évidence. Une augmentation du niveau d'expression du gène c-Fos est retrouvée chez les patients présentant les télomères les plus courts. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre la longueur des télomères et le niveau d'expression d'OGG1 (p = 0,636).

**Conclusion** — Nos résultats confortent les données de la littérature selon lesquelles, les processus inflammatoires, rencontrés notamment au cours de l'HTA, sont associés à un raccourcissement des télomères par le biais d'atteintes d'ordre radicalaire.

## A034

### EFFET ANTICOAGULANT ET ANTITHROMBOTIQUE DE LA PN-1 PLAQUETTAIRE

Y. BOULAFTALI<sup>1</sup>, F. ADAM<sup>1</sup>, L. VENISSE<sup>1</sup>, V. OLLIVIER<sup>1</sup>, M.-C. ALESSI<sup>2</sup>, M. BRYCKAERT<sup>1</sup>, R. FAVIER<sup>3</sup>, V. AROCAS<sup>1</sup>, M. JANDROT-PERRUS<sup>1</sup>, M.-C. BOUTON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité Inserm 698, PARIS, France

<sup>2</sup> UMR 626, MARSEILLE, France

<sup>3</sup> Hôpital Armand Trousseau, PARIS, France

La protéase nexine 1 (PN-1), serpine tissulaire, est le plus puissant inhibiteur connu de la thrombine *in vitro* et inhibe l'uPA et le t-PA. Cependant son rôle physiologique dans l'hémostase et la thrombose n'est pas établi.

Notre objectif a été de caractériser la PN-1 plaquettaire quant à sa localisation et à sa fonction régulatrice de la thrombine et de l'uPA *in vitro* et *in vivo*.

La PN-1 a été analysée par cytométrie en flux et western blot. L'inhibition de la thrombine et l'uPA a été mesurée par un test amidolytique. La génération de thrombine a été analysée par thrombinographie sur plasma riche en plaquettes (PRP). La sensibilité des plaquettes sauvages (WT) et PN-1-/- à la thrombine a été mesurée par FACS et agrégation plaquettaire. Le rôle de la PN-1 plaquettaire dans la thrombose a été d'abord étudié *ex vivo* en chambre de perfusion sur matrice de collagène et *in vivo* par microscopie intravital.

La PN-1 est détectée à la membrane et dans les granules  $\alpha$  des plaquettes. La PN-1 sécrétée lors de l'activation plaquettaire inhibe la thrombine et l'uPA. La génération de thrombine en PRP en absence de PN-1 est significativement augmentée (anticorps bloquant ou plaquettes PN-1-/-) indiquant que la PN-1 plaquettaire inhibe la thrombine et sa génération. La mesure de l'expression de la Psélectine et le taux d'agrégation des plaquettes PN-1-/- montre une hypersensibilité à la thrombine par rapport aux plaquettes WT.

*Ex vivo*, la formation de thrombi sur une surface de collagène en condition de flux est également augmentée en absence de PN-1. *In vivo*, le déficit en PN-1 résulte en une accélération de l'occlusion vasculaire dans un modèle de thrombose expérimentale.

Nous montrons pour la première fois que la PN-1 plaquettaire, stockée dans le granule  $\alpha$  a une activité anticoagulante via l'inhibition de la thrombine et de sa génération. La PN-1 plaquettaire inhibe également l'uPA aussi bien que le PAI-1 plaquettaire. Nous montrons également pour la première fois que la PN-1 plaquettaire a une activité antithrombotique et joue un rôle régulateur sous estimé dans la thrombose.

## A035

### TSP1 MEDIATES ECHINOCYTOSIS AND CONTRIBUTES TO VASO-OCCLUSIVE CRISES IN SICKLE CELL DISEASE

S CAMUS<sup>1</sup>, P. EREN<sup>1</sup>, D. FRANCOIS<sup>1</sup>, P. BONNIN<sup>2</sup>, R. KOKODE<sup>3</sup>, M. HOYLAERTS<sup>4</sup>, A. TEDGUI<sup>1</sup>, P. THARAUX<sup>1</sup>, O. BLANC-BRUDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Cardiovasculaire Inserm-Lariboisière, U689, Hôpital Lariboisière, Paris, France

<sup>2</sup> Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles et Inserm U965, Hôpital Lariboisière, Paris, France

<sup>3</sup> Service d'Hématologie, Hôpital Kremlin-Bicêtre, Paris, France

<sup>4</sup> Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgium

In sickle cell disease (SCD), the expression of mutated hemoglobin allows the formation of rigid, sickle-shaped and dense red blood cell (RBC). In patients, hypoxia, exercise or cold lead to vaso-occlusive crisis (VOC), with hypoperfusion in microcirculatory beds occluded by sickled, dense erythrocytes, causing ischemic tissue injury with intense pain. The renal medulla has substantial metabolic activity, with high oxygen demand, hyperosmolarity and low pH. Kidneys are thus particularly vulnerable to hypoxia and acute VOC. Platelet TSP1 released during thrombosis, and its RBC surface receptor

CD47 have previously been involved in increased adhesion of RBC to endothelium in SCD. Here, we investigated other effects of TSP1 and CD47 on RBC in connection with VOC. We used SAD transgenic mice expressing mutated human hemoglobin ( $\alpha 2\beta 2$ SAD). We found that circulating TSP1 levels increased 4 fold in SAD mice under hypoxia (8% O<sub>2</sub>) for 16 hours, whereas TSP1 levels were strongly depressed in wild type mice (-70%). Electron microscopy and ektacytometry revealed that TSP1-derived CD47 agonist peptides in synergy with hypoxia triggered RBC echinocytosis in healthy RBC (+600%). Wild type echinocytes however conserved constant numbers of short round spicules. SAD RBC also responded with increased echinocytosis (+100%), coupled to a doubling in the aberrantly rigid, fine and elongated spicules they carried, compared to normoxia. No true sickling was observed. Intravenous injection of CD47 agonist to anesthetized wild type mice significantly reduced renal blood flow by 17%, as assessed by echo-Doppler, indicating increased renal microvascular resistance. Renal blood flow returned to normal values within 5 minutes. In contrast, administration of CD47 agonist peptides to SAD mice reduced renal blood flow by 48%, for more than 20 minutes. Mutated control peptides had no effects, and we observed no significant modulation of heart beat rates, or cardiac output. We concluded that the release of TSP1 may synergize with hypoxia to mediate echinocytosis and contribute to lasting vaso-occlusive crises.

## A036

### LA VE-CADHÉRINE DANS L'INFLAMMATION ET LE CANCER

T. MANNIC<sup>1</sup>, J.-O. CONTRERES<sup>2</sup>, C. LE HENAFF<sup>2</sup>, O. VITTECOQ<sup>3</sup>, E. DUPUY<sup>2</sup>, C. REMY<sup>4</sup>, G. TOBELEM<sup>2</sup>, P. HUBER<sup>1</sup>, I. VILGRAIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U882, Grenoble, France

<sup>2</sup> IVS, Paris, France

<sup>3</sup> U519, Rouen, France

<sup>4</sup> U594, Grenoble, France

L'endothélium vasculaire est la première couche de cellules en contact avec le flux sanguin. Au cours de processus pathologiques, les cellules endothéliales subissent des remaniements notoires dus à la présence de nombreux facteurs de croissance. Dans ce cas, l'intégrité de l'endothélium, assurée principalement par les jonctions adhérentes endothéliales dont la V(cascler) E(ndothelial)-cadhérine est la protéine clé, est perturbée.

Notre objectif est de mieux comprendre les modifications des jonctions endothéliales et plus particulièrement de la VE-cadhérine. La phospho-VE-cadhérine est une caractéristique des cellules endothéliales activées *in vitro*. Notre laboratoire a montré l'existence d'une forme phosphorylée de VE-cadhérine *in vivo* au cours de l'angiogenèse physiologique (stimulation hormonale). Des tyrosines importantes ont été identifiées : la tyrosine 685, qui est la cible directe de la tyrosine kinase Src en réponse au VEGF ainsi que les tyrosines 658 et 731. De plus, la VE-cadhérine peut être sensible à la protéolyse.

Dans ce travail, la phosphorylation de la VE-cadhérine a été étudiée dans un contexte pathologique d'inflammation et de cancer. Pour cela, deux modèles murins de tumeurs hépatiques ou cérébrales ont été analysés. Par l'utilisation d'anticorps anti-phosphosite spécifiques, j'ai démontré l'existence *in vivo* d'une forme phosphorylée de VE-cadhérine sur le site Y658. L'analyse de l'inhibition d'une tyrosine kinase particulière, SYK, par si RNA ainsi que par des expériences de phosphorylation de la VE-cadhérine